

Е. В. Санарова, А. П. Полозкова, И. Г. Меерович, А. В. Ланцова,
Е. В. Игнатьева, О. Л. Орлова, Н. А. Оборотова

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА КАЧЕСТВО ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НОВОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА – ТИОСЕНСА

Учреждение Российской академии медицинских наук Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН (РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН), Москва, Россия

Разработан состав стабильной лиофилизированной липосомальной лекарственной формы тиосенса, содержащий лецитин – холестерин – PEG-2000-DSPE в молярном соотношении 1/0,22/0,002 и раствор сахарозы в качестве криопротектора в соотношении лецитин – криопротектор 1/9. Оценено влияние озвучивания, гомогенизации и фильтрации на качество препарата. Результаты предварительных исследований позволяют сделать вывод о стабильности полученной лекарственной формы тиосенса в процессе хранения.

Ключевые слова: липосомы, тиосенс, гомогенизация, фильтрация, криопротектор

Фотодинамическая терапия (ФДТ) новообразований является перспективным направлением в лечении опухолей. Воздействие на опухоль введенного фотосенсибилизатора (ФС) осуществляется путем облучения патологического участка оптическим излучением, поглощаемым ФС, способным фотокатализировать образование синглетного кислорода и активных радикалов, оказывающих повреждающее действие на опухолевые клетки [1, 2].

В ФГУП ГНЦ “НИОПИК” синтезирован ряд комплексных соединений – производных фталоцианинов, имеющих основной пик поглощения в области 715 – 745 нм [3, 4]. Поглощение света в инфракрасной области позволяет увеличить глубину терапевтического воздействия и снизить токсический эффект для окружающих здоровых клеток [5]. ФС “Тиосенс” на основе липосомальной дисперсии тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия оказался наиболее перспективным для доклинического изучения и продвижения в клинику за счет высокой фотодинамической активности – препарат тормозит рост опухоли Эрлиха на 80% и лимфолейкоза Р-388 на 84% [6, 7].

В биологических экспериментах показано, что селективность накопления тиосенса в опухоли Эрлиха по сравнению с нормальной тканью определяется липосомальной фракцией с размером везикул менее 150 нм [9]. В связи с этим при обосновании эффективности состава и технологии липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ) необходимо контролировать как количественное включение тиосенса в липосомальный бислой, так и средний диаметр полученных везикул.

Для достижения терапевтического эффекта липосомальные системы должны обеспечивать высокое включение лекарственного препарата в бислой [8]. Поэтому потребовались дальнейшие исследования по оптимизации состава и масштабированию технологии создания стандартной и стабильной ЛЛФ тиосенса для внутривенного введения.

При получении ЛЛФ тиосенса в качестве основных компонентов бислоя использовали лецитин (яичный фосфатидилхолин) и холестерин. Для снижения вероятности захвата липосом при введении в кровотоки клетками ретикулоэндотелиальной системы добавляли дистеароилфосфатидиламин, конъюгированный с гидрофильным полимером – полиэтиленгликолем (ПЭГ-2000).

Экспериментальная часть

В работе использовали тиосенс (ФГУП ГНЦ “НИОПИК”); лецитин E PC S (Lipoid, Германия); холестерин (Sigma, Япония); PEG-2000-DSPE (Lipoid, Германия); сахароза (Химмед, Россия); коллидон (Kollidon 17 PF) (BASF, Германия); глюкоза (Химмед, Россия); маннит (Реахим, Россия); лактоза Ph Eur (Sigma-Aldrich GmbH, Германия); хлороформ стабилизированный (х.ч.) (Химмед, Россия); спирт этиловый 95 % (ФС 42-3072-94).

Исследования проводили на роторном испарителе BÜCHI Rotavapor R-200 (BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария); наносайзере Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США); миниэкструдере Avanti Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., США); экструдере LIPEX™ (Northern Lipids, Inc.; Lipex Biomembranes, Inc., Канада); спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия); низкотемпературной камере NZ 280/75.A (Frigera, Чехия); системе очистки воды Elix 5 (Millipore S. A. S., Франция); весах Sartorius LA 1200 S (Sartorius AG, Германия); нейлоновых мембранных фильтрах N66 диаметром 25 мм с размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (Pall Corporation, США; ООО Палл Евразия, Россия); поликарбонатных мембранных фильтрах Nuclepore (Whatman, Великобритания) диаметром 25 мм, с размером пор 0,4 и 0,2 мкм; гомогенизаторе высокого давления Microfluidizer M-110S (Microfluidics, США); установке сублимационной сушки “Edwards Minifast DO.2” (Ero Electronic S.p.A.,

Италия); ультразвуковой (УЗ) ванне Trassonic (Elma, Англия).

Получение липосомальной лекарственной формы тиосенса

Для выбора состава ЛЛФ тиосенса в ходе исследования были наработаны 11 модельных составов (табл.1), качество которых оценивали по показателям: размер липосом и количество включенного препарата (КВП) в липосомальный бислой.

Технология получения многослойных (мультиламеллярных) липосом тиосенса

Ингредиенты липидного бислоя (яичный фосфатидилхолин, холестерин, PEG-2000-DSPE) растворяли в хлороформе. Субстанцию тиосенса растворяли в 10 мл хлороформа в УЗ-ванне в течение 5 – 10 мин и добавляли к раствору липидов. Полученный раствор фильтровали (размер пор фильтра 0,22 мкм) и переносили в круглодонную колбу. Растворитель отгоняли при температуре фазового перехода липидов (+37 °С) на роторном испарителе с получением однородной полупрозрачной липидной пленки. Пленку гидратировали определенным количеством деионизированной воды (18 – 20 мл с учетом набухания липидов) при pH 6,2 – 7,2. Предварительную фильтрацию полученной дисперсии мультиламеллярных везикул проводили на экструдере LIPEX™ через фильтр с размером пор 1,2 мкм.

Получение однослойных (моноламеллярных) липосом тиосенса

Для измельчения липосом использовали методы экструзии, озвучивания и гомогенизации.

Экструзия. На начальном этапе исследований при получении небольших объемов препарата (до 25 мл) дисперсию мультиламеллярных везикул после фильтрации через фильтр с размером пор 1,2 мкм измельчали на ручном миниэкструдере Avanti Mini-Extruder, последовательно пропуская через фильтры с размерами пор 0,4 (1 раз) и 0,2 мкм (11 раз). Однородность липосом оценивали на наносайзере Nicomp 380 Submicron Particle Sizer.

Таблица 1

Размер везикул и включение тиосенса в липосомы различных составов

Состав	Молярное соотношение компонентов (Л:Х:Р)*	Средний размер везикул после фильтрации и экструзии, нм	КВП, %
1	1/0,22/0,002	344 ± 9	90,0
2	1/0,12/0,002	300 ± 4	83,0
3	1/0,12/0,003	235 ± 8	55,0
4	1/0,22/0,001	231 ± 26	55,0
5	1/0,22/0,004	196 ± 7	84,0
6	1/0,31/0,002	221 ± 6	78,0
7	1/0,13/0,002	164 ± 8	54,0
8	1/0,18/0,002	186 ± 4	90,0
9	1/0,29/0,003	234 ± 8	74,0
10	1/0,22/0,002	161 ± 8	98,0
11	1/0,20/0,002	195 ± 10	88,0

* Л – лецитин, Х – холестерин, Р – PEG-2000-DSPE.

Ультразвуковое измельчение. После фильтрации через фильтр с размером пор 1,2 мкм измельчали с помощью УЗ состав 1 – в ультразвуковой ванне Trassonic в течение 30 мин.

Гомогенизация. В процессе масштабирования технологии измельчение мультиламеллярных везикул проводили на гомогенизаторе высокого давления Microfluidizer M-110S. Выбор оптимальных параметров гомогенизации ЛЛФ тиосенса проводили путем измельчения на гомогенизаторе высокого давления с целью определения оптимального времени измельчения при объеме загрузки – 300 – 350 мл. Определение размеров осуществляли после каждого цикла измельчения.

Стерилизующая фильтрация ЛЛФ тиосенса

К дисперсии моноламеллярных липосом, полученных любым из 3 методов, добавляли необходимый объем водного раствора криопротектора определенной концентрации, аккуратно перемешивали и проводили

Таблица 2

Размеры липосом тиосенса после добавления криопротекторов и замораживания при температуре –18 °С

		Средний размер липосом тиосенса, нм				
После получения		140 ± 11, 914 ± 23				
После фильтрации и экструзии		175 ± 15				
		Криопротектор				
Массовое соотношение лецитин/криопротектор		сахароза	глюкоза	коллоидон	лактоза	маннит
1/3	До замораживания	174 ± 4	188 ± 4	210 ± 5	189 ± 7	92 ± 3 269 ± 10
	После замораживания	189 ± 13	161 ± 6	77 ± 3 534 ± 12	90 ± 2 236 ± 5	71 ± 3 700 ± 26
1/12	До замораживания	166 ± 8	176 ± 9	52 ± 4 238 ± 11	189 ± 4	128 ± 3 393 ± 11
	После замораживания	169 ± 4	186 ± 4	42 ± 1 320 ± 8	174 ± 4	101 ± 3 814 ± 18

фильтрацию последовательно через фильтры с размером пор 0,45 и 0,22 мкм (стерилизующая фильтрация).

Стабилизация липосомальной дисперсии путем сублимационной сушки

Так как в водной дисперсии липосомы нестабильны и проявляют тенденцию к слиянию и увеличению размеров [10, 11], для получения лекарственной формы с необходимым сроком хранения проводили лиофильную сушку. Предварительно оценивали защитный эффект криопротекторов при замораживании липосом ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Размер липосом определяли до замораживания и после размораживания водной дисперсии с растворами глюкозы, лактозы, маннита или коллидона (Kollidon 17 PF) в массовом соотношении лецитин – криопротектор 1/3 и 1/12, а также растворов сахарозы с массовым соотношением яичный лецитин – криопротектор 1/3, 1/6, 1/9, 1/12 и 1/16.

Стандартизация липосомальной дисперсии тиосенса

Определение размеров. На всех стадиях получения липосом производили измерение размера везикул на наносайзере Nicomp 380 Submicron Particle Sizer. 1 мл липосомальной дисперсии помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили водой до метки. При определении размеров липосом в лиофилизате содержимое флакона регидратировали в 10 мл деионизированной воды для получения разбавленной гомогенной дисперсии. Далее отбирали 1 мл полученной дисперсии и переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем дистиллированной водой до метки.

Определение включения. В электронном спектре поглощения 0,0003% спирто-хлороформного раствора субстанции тиосенса в области от 300 до 800 нм обнаружены максимумы при 717 ± 4 нм, 648 ± 4 нм, 342 ± 3 нм, причем наиболее интенсивным является пик на уровне 717 ± 4 нм. В связи с этим количественное содержание тиосенса, включенного в бислой липосом, определяли спектрофотометрически с использованием рабочего стандартного образца (PCO) при длине волны 717 ± 4 нм. Определению включения предшествовало отделение невключившегося препарата путем фильтрации последовательно через фильтры с размером пор 0,45 и 0,22 мкм. Другие ингредиент-

ты, входящие в состав липосом, в этой области практически не поглощают, что было доказано путем измерения оптической плотности пустых липосом ($A = 0,006$).

Определение рН. Проводили потенциометрическое определение рН в липосомальной дисперсии и лиофилизате. При измерении в лиофилизированной форме содержимое флакона суспендировали в 10 мл воды.

Результаты и их обсуждение

Оценка влияния состава на размеры липосом и эффективность включения тиосенса

В табл. 1 представлены результаты оценки качества составов ЛЛФ тиосенса по параметрам – размер везикул и количество включенного препарата (КВП, %). Во всех представленных модельных составах липосомы измельчались путем экструзии через поликарбонатные фильтры, кроме состава 1, который после получения измельчали УЗ.

Оценка результатов определения размеров везикул и эффективности включения показывает, что составы 3, 4 и 7 показали низкий уровень КВП. По-видимому, это связано с недостаточным содержанием в бислое холестерина для составов 3 и 7, и PEG-2000-DSPE для состава 4. Высокий уровень PEG-2000-DSPE (состав 5) обеспечивал получение везикул размером 196 ± 7 нм с включением на уровне 84%. Составы 2 и 8 с диаметром липосом около 200 нм продемонстрировали достаточно высокое КВП, но трудно экструдировались в связи с завышенным содержанием лецитина, что осложняло технологический процесс. На основе состава 6 получали липосомы с диаметром > 200 нм, КВП было на среднем уровне (78%). Составы 2, 3, 8, 11 после смывания пленки давали избыточное количество пены, препятствующее процессу фильтрации и экструзии. Наилучшим по предложенным выше критериям оказался состав 10, обеспечивающий высокое КВП (98%) и приемлемый размер липосом (161 ± 9 нм). Молярное соотношение лецитин – тиосенс составило для этого состава 270/1.

Состав 1, который измельчали УЗ, нестабилен во времени – первоначально липосомы основной фракции (78%) имели диаметр менее 100 нм, но с течением времени они увеличивались до 344 ± 9 нм. Кроме того, воздействие УЗ может катализировать перекисное окисление лецитина, снижая качество липосомального препарата.

Таблица 3

Влияние количественного содержания сахарозы на размер липосом тиосенса

Соотношение лецитин/сахароза	Размеры липосом тиосенса, нм	
	после добавления раствора сахарозы	после замораживания с раствором сахарозы
1/3	174 ± 4	179 ± 3
1/6	173 ± 4	156 ± 4
1/8	167 ± 4	159 ± 4
1/12	166 ± 8	169 ± 4
1/16	154 ± 4	104 ± 3 240 ± 11

Таблица 4

Размер липосом (нм) тиосенса в зависимости от времени гомогенизации

Время измельчения, мин					
2	4	6	8	10	12
76 ± 3	37 ± 2	25 ± 1	63 ± 3	39 ± 1	28 ± 1
387 ± 8	169 ± 4	143 ± 6	323 ± 7	147 ± 5	126 ± 5

Сравнение эффективности измельчения липосом УЗ и экструзией на примере предложенных составов показало, что применение УЗ в технологии липосомальных препаратов ограничено недостаточной стабильностью липосом, полученных таким методом, и увеличением вероятности окисления фосфолипидов. Экструзия позволяет получить гомогенные везикулы, сохраняющие свои размеры в течение 2 недель в водном растворе.

Выбор криопротектора и определение его оптимальной концентрации

Результаты применения криопротекторов (сахароза, глюкоза, коллидон, лактоза, маннит) представлены в табл. 2. Из нее видно, что коллидон и маннит не обеспечивают сохранения однородности липосом и приводят к значительному увеличению размеров везикул. Массовое соотношение лецитин – сахароза 12/1 позволяет сохранить первоначальный размер везикул. Глюкоза и лактоза давали положительные результаты при обеих концентрациях до и после замораживания, но после цикла замораживания – оттаивания на дне флаконов образовывались мутные осадки.

В связи с тем, что наилучший протективный эффект показала сахароза нами был проведен эксперимент с использованием ее в качестве криопротектора в расширенном диапазоне концентраций (табл. 3). Добавление сахарозы в соотношении лецитин – криопротектор 1/16 вызывает расслоение липосом на две фракции: с размером менее 100 и более 200 нм. В соотношении лецитин – сахароза 1/3 протективный эффект криопротектора недостаточен, т.к. после цикла замораживания – оттаивания размер липосом увеличивается более чем на 15%, в то время как соотношения лецитин – сахароза 1/6, 1/9 и 1/12 обеспечивают стабильность размеров липосом. На основании полученных данных можно сделать вывод о возможности использования для лиофилизации ЛЛФ тиосенса в качестве криопротектора сахарозы в массовом соотношении лецитин – сахароза 1/6 – 1/12.

Определение числа циклов гомогенизации

Проведенные исследования позволили выбрать оптимальный состав ЛЛФ тиосенса, содержащий лецитин – холестерин – PEG-2000-DSPE в молярном соотношении 1/0,22/0,002, в качестве криопротектора выбрана сахароза в массовом соотношении лецитин – сахароза 1/9. На основе этого состава получена липо-

сомальная дисперсия, которую измельчали на гомогенизаторе высокого давления с целью определения оптимального времени (числа циклов) измельчения при объеме загрузки 300 – 350 мл.

Определение размеров осуществлялось через каждые 2 мин измельчения, что соответствует 1 циклу гомогенизации. Замечено, что через 8 мин (4 цикла) происходит резкий рост диаметра везикул, что приводит к выпадению в осадок фрагментов бислоя с включенной в них субстанцией тиосенса. Поэтому при таком объеме загрузки время измельчения не должно превышать 6 мин (3 цикла).

Оценка снижения включения тиосенса после фильтрации

Выбрав оптимальное время измельчения, нарабатывали две липосомальные дисперсии тиосенса, КВП в которых определяли после получения, гомогенизации и фильтрации последовательно через фильтр с размером пор 0,45 мкм и 0,22 мкм (табл. 5).

Оценка снижения КВП за счет гомогенизации и фильтрации показала незначительное уменьшение этого показателя (2 – 4%) в обеих дисперсиях. Такие значения говорят о высоком КВП и о незначительном выпадении в осадок свободного препарата.

Мониторинг качества серий тиосенса после лиофилизации и при хранении

На основании полученных данных наработаны 2 серии лиофилизированной ЛЛФ тиосенса и выбраны критерии ее качества: описание (сухая пористая масса светло-зеленого цвета), подлинность (спектр поглощения имеет максимумы при длинах волн 342 ± 3 , $648 \pm 4,717 \pm 4$ нм), средняя масса содержимого флакона (0,89 – 0,99 г), pH (6,2 – 7,2), потеря в массе при высушивании (не более 3 %), размер частиц (не более 200 нм) и количественное содержание тиосенса (1,3 – 1,7 мг/флакон). Указанные серии анализировались сразу после получения и в процессе хранения (условия хранения – защищенное от света место, температура -18°C) по основным показателям: pH, средний размер липосом, количественное содержание (табл. 6).

При хранении серии I в течение 1 года содержание действующего вещества во флаконе оставалось неизменным, а pH и средний размер соответствовали указанным параметрам качества. Серия II через 6 мес

Таблица 5
Включение тиосенса в липосомы на различных этапах технологического процесса

КВП, %	Дисперсия	
	1	2
Свежеполученная дисперсия	100 ± 2	97 ± 2
Гомогенизация + Фильтрация 0,45 мкм	99 ± 1	96 ± 1
Гомогенизация + Фильтрация 0,45 мкм + 0,22 мкм	96 ± 1	94 ± 2

Таблица 6
Показатели качества серий ЛЛФ тиосенса после получения и при хранении

Серия	Срок хранения, мес	pH	Средний размер липосом, нм	Количественное содержание, мг/флакон
I	–	7,1 ± 0,1	143 ± 9	1,4
	6	6,8 ± 0,2	177 ± 6	1,4
	9	6,5 ± 0,1	173 ± 4	1,4
II	12	7,1 ± 0,1	170 ± 7	1,4
	–	6,2 ± 0,2	154 ± 6	1,3
	6	6,2 ± 0,1	159 ± 10	1,3

хранения имела показатели, близкие к значениям, определенным после получения. Серии заложены на хранение, и определение срока годности лиофилизированной ЛЛФ тиосенса продолжается.

Работа выполнена в рамках научно-технической программы “Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний” при финансовой поддержке Правительства г. Москвы.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. R. Allison, *Photodiagn. Photodynam. Ther.*, **6**, 231 – 234 (2009).
2. R. R. Allison, and C. H. Sibata, *Photodiagn. Photodynam. Ther.*, **7**, 61 – 75 (2010).
3. З. С. Смирнова, И. Г. Меерович, Е. А. Лукьянец, *Рос. биотер. ж.*, **1**, 54 – 60 (2004).
4. Л. Г. Гатинская, Н. А. Дмитричева, Е. В. Игнатъева и др., *Рос. биотер. ж.*, **1**(5), 33 – 34 (2006).
5. И. Г. Меерович, А. А. Стратонников, А. В. Рябова, *Рос. биотер. ж.*, **3**, 37 – 42 (2004).
6. I. G. Meerovich, Z. S. Smirnova, N. A. Oborotova, et al., *Bul. Experim. Biol. Med.*, **139**(4), 427 – 430 (2005).
7. И. Г. Меерович, Н. А. Оборотова, *Рос. биотер. ж.*, **4**, 3 – 8 (2007).
8. B. Mishra, B. V. Patel, S. Tiwari, *Nanomedicine: Nanotechnol., Biol., Med.*, **6**, 9–24 (2010).
9. Д. Г. Гуревич, И. Г. Меерович, Г. А. Меерович и др., *Рос. биотер. ж.*, **2**, 45 – 49 (2007).
10. C. Chen, D. Han, C. Cai, et al, *J. Control. Rel.*, **142**, 299 – 311 (2010).
11. W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, et al., *Advanced Drug Del. Rev.*, **58** (15), 1688 – 1713 (2006).

Поступила 03.06.11

INFLUENCE OF TECHNOLOGICAL FACTORS ON QUALITY OF LIPOSOMAL FORM OF NEW PHOTOSENSITIZER TIOSENS

E. V. Sanarova, A. P. Polozkova, I. G. Meerovich, A. V. Lantsova, E. V. Ignat'eva, O. L. Orlova, and N. A. Oborotova

Blokhin, Russian Oncological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478, Russia

Optimum composition of a stable lyophilized liposomal formulation of tiosens is established, which includes lecithin, cholesterol, and PE-PEG-2000 in a molar ratio of 1 : 0.22 : 0.002 and sucrose solution as cryoprotector in a weight ratio of lecithin/cryoprotector = 1/9. The effects of sonication, homogenization, and filtration on the quality of the liposomal preparation have been studied. The results of preliminary studies lead to a conclusion about satisfactory storage stability of the liposome form of tiosens.

Key words: liposomes, tiosens, homogenization, filtration, cryoprotector